动 物 学 研 究 2003, Apr. 24 (2): 116~120 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

黄喉鹀高级发声中枢及其壳区的神经投射和P物质在发声听觉中枢的分布

张信文[1], 曾少举[2], 李 佳[2], 马 骏[2], 左明雪[2,3]
(1. 海南师范学院 生物学系, 海南 海口 571158, zhangxw2844@sina.com; 2. 北京师范大学 生命科学学院, 北京 100875)

摘要: 用生物素示踪法和P物质(SP)免疫组化技术研究表明: 黄喉鹀的高级发声中枢(HVc)接受端脑听区(L)、新纹状体中部界面核、新纹状体巨细胞核(MAN)、丘脑葡萄形核、桥脑蓝斑核的传入, 并有神经纤维投射到古纹状体栎核(RA)和嗅叶X区(X); HVc壳投射到RA壳并接受L的传入。听觉控制与学习通路与发声中枢之间有许多神经联系, 提示黄喉鹀发声学习依赖于听觉反馈。在HVc、RA和MAN有SP阳性细胞体, 在X、中脑背内侧核和延髓舌下神经核气管鸣管部、丘脑卵圆核壳区、中脑背外侧核壳区及中脑丘间核有SP阳性纤维和终末。SP广泛分布于发声-听觉中枢, 可能参与了它们的活动。

关键词: 黄喉鹀; 发声核团; 听觉中枢; 神经投射; P物质
中图分类号: Q42; Q959.739 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2003)02-0116-05

Projections of the High Vocal Center and Its Shell, and Distribution of Substance P in the Vocal-Auditory Center in *Emberiza elegans*

ZHANG Xin-wen[1], ZENG Shao-ju[2], LI Jia[2], MA Jun[2], ZUO Ming-xue[2]
(1. *Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou* 571158, *China*;
2. *College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing* 100875, *China*)

Abstract: Using the neural tracer biotinylated dextran amine and the immunohistochemical methods, we found that high vocal center (HVc) in *Emberiza elegans* received projections from the auditory area-field (L), nucleus interfacialis of midneostriatum, magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (MAN), nucleus uvaeformis, and locus ceruleus of pons; HVc projected to the robust archistriatum (RA) and area X of lobus (X). HVc shell projected to the RA cup and received from L. As there were many neural connections among the vocal control and learning pathway, and the auditory center, vocal learning may depend on a feedback of listening senses. Substance P (SP) labeled neurons distributed in HVc, RA and MAN. SP labeled fibers and terminals distributed in X, the nucleus dorsalis medialis, the nucleus hypoglossi, pars tracheosyringealis, the nucleus ovoidalis shell, the shell of mesencephalicus lateralis, pars dorsalis, and the nucleus intercollicularis. SP widely distributed in vocal-auditory centers, and may involve in their activities.

Key words: *Emberiza elegans*; Vocal nucleus; Auditory center; Nervons projection; Substance P

鸣禽的鸣啭是一种习得性行为, 是除人类语言之外最复杂的发声行为活动, 且与人类语言的学习过程有相似性(Nottebohm et al, 1990; Doupe & Kuhl, 1999)。因此, 研究鸟类发声的机理有助于对人类语言及中枢调控机理的理解。近年来国内外对鸟类鸣啭的神经机制研究表明, 发声的控制系统主要由一条控制通路(输出)和一条学习与记忆回路组成(Brainard & Doupe, 2000; Burt et al,

收稿日期: 2002-07-08; 接受日期: 2002-12-16
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39960014, 39870097, 30060027); 教育部、海南省骨干教师资助项目
3. 通讯作者

2000）。端脑的高级发声中枢（high vocal center，HVc）接受听觉传入投射（Vates et al，1997）。听觉中枢和发声中枢周围存在壳式结构，包括HVc、古纹状体栎核（robust archistriatum，RA）、丘脑背外侧核内侧部（dorsolateral nucleus of the anterior thalamus，DLM）、中脑背外侧核（mesencephalicus lateralis，pars dorsalis，MLd）、中脑丘间核（nucleus intercollicularis，ICo），以及丘脑卵圆核（nucleus ovoidalis，OV）壳或壳区（Veenman et al，1995；Vates et al，1996）。这些壳式结构也参与听觉和发声的活动（Mello et al，1998）。

P物质（substance P，SP）是11个氨基酸组成的速激肽。作为脑内的一种神经调质，它广泛分布于哺乳动物中枢神经系统内，参与抑制和兴奋多种神经递质的释放（Nakanishi，1991；Otsuka，1993；Liu & Ju，1998）。

为揭示HVc及其壳区对鸟类鸣啭学习与控制的神经机制，我们用神经投射双向示踪法及SP免疫组织化学方法，对鸣禽黄喉鹀HVc及其壳区的神经投射，以及SP在发声控制系统中的分布做了探索。

1　材料和方法

1.1　实验动物

选用成年黄喉鹀46只（♂35，♀11；体重12～17 g），分为3组：其中26只（♂20，♀6）用于HVc核注射，12只（♂8，♀4）用于HVc壳注射，8只（♂7，♀1）用于SP免疫组织化学实验。

1.2　试剂和仪器

所用神经投射双向示踪剂为生物素结合的葡聚糖胺（biotionylated dextran amine，BDA）和霍乱毒素辣根过氧化物酶（cholera toxin horseradish peroxidase，CTHRP），均为Sigma产品。ABC复合物（Avidin-Biotin-Complex）为Vector公司产品，用1:200，0.03%的Triton X-100的0.1 mol/L磷酸缓冲液稀释。SP免疫组织化学试剂为1:200的抗SP血清（Santa Cruz Corp.）。显微注射用四道压力程控显微注射仪（BioProbes，PM 2000B4Z型，美国Molecular Probe公司）。

1.3　神经投射双向示踪法

10%氨基甲酸乙酯（1 mL/100 g）麻醉动物，固定在鸟头立体定位仪上。对HVc注射组，用尖端外径40 μm的玻璃微电极将5% 0.02 μL的BDA（或CTHRP）溶液经四道压力程控显微注射仪注入HVc（脑立体座标P = 0.1～0.2 mm，L/R = 2.6～2.7 mm，H = 0.4～0.5 mm）。对HVc壳注射组，注射范围依据Vates et al（1997）的定位，HVc壳的界线可达HVc外缘的0.5～0.8 mm。用直径80 μm的金属微电极，电流强度1～2 mA（稳压直流），通电30 s左右，损毁HVc内外侧两点，每点损毁半径0.2～0.3 mm，损毁深度0.3～0.5 mm；然后将BDA（或CTHRP）0.02 μL注入HVc的腹侧壳区（壳区厚度0.5～0.8 mm）。

BDA处理组动物存活4 d（CTHRP组2 d），左心室灌流后用含4%多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸缓冲液（pH 7.4）固定，在30%蔗糖的0.1 mol/L磷酸缓冲液中过夜。切制40 μm的脑额状或矢状冰冻切片，隔片取一，0.1 mol/L的磷酸缓冲液洗涤，置ABC复合物4 ℃孵育12 h，0.01 mol/L的磷酸缓冲液漂洗（pH 7.4），DAB-nickel成色反应（CTHRP用TMB成色），光镜观察。

1.4　SP免疫组织化学方法

10%氨基甲酸乙酯深度麻醉动物，开胸经左心室灌流生理盐水100 mL冲洗血液，再用150 mL含0.2%戊二醛、4%多聚甲醛和0.2%苦味酸的0.1 mol/L的磷酸缓冲液（pH 7.2）灌注15 min。灌毕立即取脑，浸入4%多聚甲醛中固定4～8 h，在30%蔗糖的0.1 mol/L磷酸缓冲液内4 ℃过夜。切制40 μm矢状冰冻切片，收集于0.1 mol/L磷酸缓冲液（pH 7.4）内，按下述步骤做SP免疫组织化学染色：切片置1:200的抗SP血清中室温下放置3 h；Biotin标记的羊抗兔IgG血清1:200室温孵育2 h；ABC复合物内结合2～3 h；DAB（0.05%）和H_2O_2（0.03%）内呈色25 min。然后将切片贴于涂有明胶的载片上，脱水透明，加拿大中性树胶封片。另一套切片做焦油紫染色，用于定位SP免疫阳性神经纤维、终末和胞体在发声和听觉中枢内的分布区域。黄喉鹀核团的定位和命名以Zhang & Lan（1994a，b）的工作为依据。对照实验用正常牛血清代替一抗或省略SP一抗。

2　结　果

2.1　HVc及其壳区的神经投射及标记物的形态分布

2.1.1　HVc壳区的神经投射　在古纹状体背束（tractus archistriatalis dorsalis，DA）有清晰的标记

纤维束，从HVc壳发出，向腹侧走行并终止于RA壳；顺行标记纤维或终末密集分布在RA壳的背外侧区0.3~0.4 mm范围内（图1）。端脑听区（auditory area-field，L）的标记细胞较小，直径10~14 μm，突起较少；标记区域可明显分为上、中、下3层，即L1、L2和L3，L2的标记细胞少于另两层（图2）；HVc壳接受L的传入投射。

2.1.2 HVc的传入投射 HVc位于新皮层脑室的下方，核团呈长梭形，喙尾长1.3~1.7 mm，背腹宽0.3~0.5 mm，内外侧长1.3~2.2 mm。在一侧HVc核内注入BDA（或CTHRP）后，可在该侧观察到标记细胞（图3）。L1、L2、L3出现较密集的标记细胞。新纹状体中部界面核（nucleus interfacialis of midneostriatum，NIf）内见到许多以多角形为主的标记细胞，胞体较小，直径10~14 μm，突起多而长（图4）。新纹状体巨细胞核（magnocellular nucleus of the anterior neostriatum，MAN）内、外侧均密布标记细胞（图5）：内侧的胞体较小，直径11~15 μm，以多角形为主，少数为三角形；外侧的胞体较大，直径15~19 μm，呈星形，突起较多较长。丘脑葡萄形核（nucleus uvaeformis）有密布的标记细胞（每张切片50~90个），多呈圆形或椭圆形；腹侧的标记细胞较小，直径13~16 μm；背侧的较大，直径15~22 μm。桥脑蓝斑核（locus ceruleus of pons，LoC）出现一些浓重的标记细胞（每张切片20~50个），胞体呈三角形或星形，直径16~22 μm，突起多而长（图6）。

2.1.3 HVc的传出投射 在RA见到密集成簇的标记终末，雄性核团（图7）体积大于雌性。在DA见到集成束状的标记纤维，它从HVc发出后，向腹侧走行并终止于RA（图7）。在嗅叶X区（area X of lobus，X）出现了稀疏的标记终末（图5），雄性核团体积亦大于雌性。

2.2 SP免疫阳性反应产物的分布

在发声控制通路的四级神经核团和壳区中，在学习与记忆回路的主要高位中枢，在部分听觉中枢和壳区内，以及在与发声-听觉中枢相联系的相关脑区均有SP免疫阳性反应产物分布。对照组未见SP免疫阳性反应产物。

2.2.1 发声通路 在HVc内可见到大量的SP免疫阳性神经细胞体(图8)，同时可见许多SP免疫阳性神经纤维向RA走行。在雄鸟的X，密集分布SP免疫阳性神经纤维、终末和胞体(图9)，雌性较雄性少。在MAN内有散在分布的SP免疫阳性神经细胞。在RA内布满了SP免疫阳性神经细胞。在发声控制的中继核团中，脑背内侧核(nucleus dorsalis medialis，DM)内有密集的SP免疫阳性神经纤维或终末，纤维染色较深(图10)；延髓舌下神经核气管鸣管部(nucleus hypoglossi，pars tracheosyringealis，nⅫts)及舌下神经(nervus hypoglossus，NⅫ)纤维内均可见到较密集的SP免疫阳性产物(图11)，同时可见浓密的SP免疫阳性NⅫ纤维从延髓向下走行。

2.2.2 听觉通路 在中继核团MLd壳区有密集的SP免疫阳性神经纤维和终末（图10），而ICo背侧部（图10）和OV壳区（图12）有较密集的SP免疫阳性神经纤维和终末。

3 讨 论

根据本实验结果并结合以往的工作，我们认为，黄喉鹀发声学习与发声控制神经通路各有一条：前者由HVc→X→DLM→MAN→RA组成；后者由HVc→RA（→DM）→nⅫts组成并支配鸣肌。HVc壳投射到RA壳，并接受端脑听区的传入投射。Zhang & Lan（1994a，b）的工作表明，中脑发声控制中枢DM与听觉中继核团MLd有交互神经联系；本研究也表明，在听觉通路与发声中枢之间有许多神经联系，如听觉高位中枢端脑听区最终投射到高位发声控制中枢。Nottebohm et al（1990）将雌雄幼鸟致聋或隔离饲养，使其失去向亲鸟学习的机会，结果实验鸟失去了鸣啭的功能或识别求偶鸣叫的能力；Brainard & Doupe（2000）也认为鸣禽发声学习与记忆功能依赖于听觉反馈。我们的实验结果支持上述观察或结论。

本文结果表明，SP免疫阳性神经细胞和纤维广泛地分布在黄喉鹀发声的控制与学习中枢，同时也分布在部分间脑至延髓的听觉中枢；而在发声中枢的邻近脑区没有SP免疫阳性反应产物。在发声学习中枢的嗅叶X区、MAN，发声控制的高位中枢HVc，发声高位运动中枢RA均分布有大量的SP免疫阳性神经纤维、终末或胞体。在发声控制中枢中脑以下的神经核团，如中脑发声控制中枢DM和延髓舌下神经核及舌下神经内均有丰富、密集的SP免疫阳性神经纤维或终末分布。在间脑听觉旁通路OV壳区、ICo背则部和中脑MLd壳内有丰富的SP免疫阳性神经纤维或终末。根据上述结果我们推测，在鸣禽发声学习记忆及发声控制的形成过

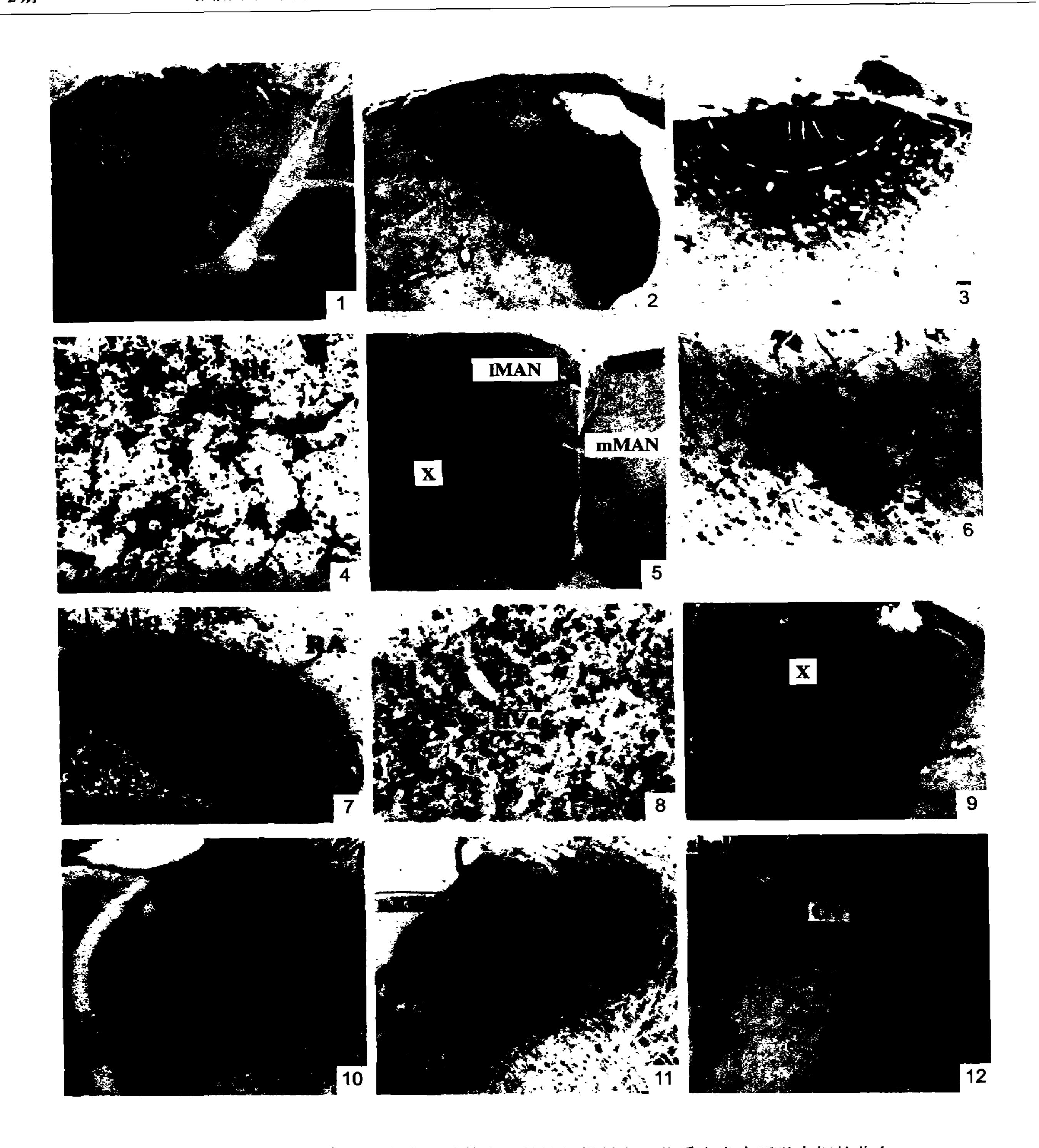


图 1～12 黄喉鹀高级发声中枢及其壳区的神经投射和P物质在发声听觉中枢的分布

Figs.1－12 Projections of the high vocal center and its shell, and distribution of substance P in the vocal-auditory center in *Emberiza elegans*

DA：古纹状体背束（Tractus archistriatalis dorsalis）；DM：中脑背内侧核（Nucleus dorsalis medialis）；HVc：高级发声中枢（High vocal center）；ICo：中脑丘间核（Nucleus intercollicularis）；L1、L2、L3：端脑听区L1、L2、L3（Auditory area-field L1，L2 and L3）；lMAN：新纹状体巨细胞核外侧部（Lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum）；LoC：桥脑蓝斑核（Locus ceruleus of pons）；MLd：中脑背外侧核（Mesencephalicus lateralis，pars dorsalis）；mMAN：新纹状体巨细胞核内侧部（Medial magnocellular nucleus of the anterior neostriatum）；NIf：新纹状体中部界面核（Nucleus interfacialis of midneostriatum）；nⅫts：延髓舌下神经核气管鸣管部（Nucleus hypoglossi，pars tracheosyringealis）；NⅫ：舌下神经（Nervus hypoglossus）；OV：丘脑卵圆核（Nucleus ovoidalis）；RA：古纹状体栎核（Robust archistriatum）；X：嗅叶X区（Area X of lobus）

1～7为冠状切片（上为背侧，右为内侧），8～12为矢状切片（上为背侧，右为喙侧）［1－7 are transverse section（dorsalis is on the

over, medialis is on the right); 8-12 are longitudinal section (dorsalis is on the over, beak is on the right)]
1. HVc壳的BDA注射点, RA壳背侧的标记终末和DA的标记纤维 (Injection site of BDA at HVc shell, labeled terminals of the dorsal RA cup and fibers of DA) ×20
2. 在HVc壳注射BDA后, 端脑听区的L1、L2和L3区的标记细胞 (After injecting BDA into HVc shell, labelled cells in field L1, L2 and L3) ×20
3. HVc的BDA注射点 (Injection site of BDA at HVc) ×40
4. 在HVc注射BDA后, NIf内的标记细胞 (After injecting BDA into HVc, labelled cells in NIf) ×400
5. 在HVc注射BDA后, mMAN和lMAN内的标记细胞及X内的标记纤维和终末 (After injecting BDA into HVc, labelled cells in mMAN and lMAN, and labelled terminals and fibers in X) ×20
6. 在HVc注射BDA后, LoC内的标记细胞 (After injecting BDA into HVc, labelled cells in LoC) ×400
7. 在HVc注射BDA后, RA内的标记终末 (After injecting BDA into HVc, labelled terminals in RA) ×80
8. HVc内的SP标记细胞 (Labeled neurons cells by Substance P in HVc) ×300
9. X内的SP标记纤维、终末和胞体 (Labeled neuronal fibers, terminals and bodies by Substance P in the area X) ×40
10. DM、ICo和MLd壳内的SP标记终末 (Labeled neurons terminals by Substance P in the DM, ICo and MLd shell) ×40
11. nⅫts内的SP标记终末 (Labeled neurons terminals by Substance P in nⅫts) ×40
12. OV壳内的SP标记终末和纤维 (Labeled neurons terminals and fibers by Substance P in the OV shell) ×80

程中，SP与其他神经调质，如脑啡呔 (Durand et al, 1998) 等一样，可能兴奋或抑制其他神经递质或受体，发挥着重要的功能，但其作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

Brainard MS, Doupe AJ. 2000. Auditory feedback in learning and maintenance of vocal behaviour [J]. *Nat. Rev. Neurosci.*, **1** (1): 31-40.

Burt JM, Lent KL, Beecher MD, Brenowitz EA. 2000. Lesions of the anterior forebrain song control pathway in female canaries affect song perception in an operant task [J]. *J. Neurobiol. Mar.*, **42** (4): 487-499.

Doupe AJ, Kuhl PK. 1999. Birdsong and human speech: Common themes and mechanisms [J]. *Annu. Rev. Neurosci.*, **22**: 567-631.

Durand SE, Liang W, Brauth SE. 1998. Methione enkephhalin immunoreactivity in the brain of the bundgerigar (*melopsittacus*): Similarities and differences and differences with respect to oscine songbirds [J]. *Comp. Neurol.*, **393** (2): 145-168.

Liu SJ, Ju G. 1998. Substance P-link immunoreactive nerve fibers in the pars distalis of the adenohypophys is of macaque monkeys [J]. *Neurosci. Lett.*, **94**: 1-4.

Mello CV, Vates GE, Okuhata S, Nottebohm F. 1998. Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (*Taeniopygia guttata*) [J]. *Comp. Neurol.*, **395** (2): 137-160.

Nakanishi S. 1991. Mammalian tachykinin receptors [J]. *Annu. Rev. Neurosic.*, **14** (1): 123-126.

Nottebohm F, Alvarez-Buylla A, Cynx J, Kirn J, Ling CY, Suter R, Tolles A, Williams H. 1990. Song learning in birds: The relation between perception and production [J]. *Phil. Trans. R. Soc.* (Lond.), **329** (1): 115-124.

Otsuka YK. 1993. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins [J]. *Physiol. Rev.*, **73** (2): 229-308.

Vates GE, Broome BM, Mello CV, Nottebohm F. 1996. Auditory pathways of caudal telencephalon and their relation to the song system of adult male zebra finches (*Taenopygia guttata*) [J]. *Comp. Neuro.*, **366** (5): 613-642.

Vates W, Vicario DS, Nottebohm F. 1997. Reafferent thalamo "cortical" loops in the song system of oscine songbirds [J]. *Comp. Neurol.*, **380**: 275-290.

Veenman CL, Wild JM, Reiner A. 1995. Organization of the avian "corticostriatal" projection system: Aretrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons [J]. *Comp. Neurol.*, **354** (1): 87-102.

Zhang XW, Lan SC. 1994a. The connection of the robust nucleus of archistriatum in the telencephalon of *Carduelis spinus* by employment of HRP [J]. *Acta Anat. Sin.*, **25** (1): 28-31. [张信文，蓝书成. 1994a. 黄雀古纹状体栎核的中枢联系——HRP法研究. 解剖学报, **25** (1): 28-31.]

Zhang XW, Lan SC. 1994b. Fiber connections of nucleus magnocellulas of anterior neostriatum and area X in *Cardulis spinus* [J]. *Acta Anat. Sin.*, **25** (2): 146-149. [张信文，蓝书成. 1994b. 黄雀新纹状体前部巨细胞核及嗅叶X区的纤维联系. 解剖学报, **25** (2): 146-149.]